

Abstract

We have discovered a "human adiponectin ELISA kit", which can specifically measure adiponectin in human blood serum (or blood plasma) or in extracted fluid from lipocytes or culture supernatant fluid. After fractioning human serum by use of gel filtration column, each fraction was measured by the present kit, and as a result, adiponectin immunity activity was detected as a plurality of peaks at above 670 kD of molecular weight. From the results, it is presumed that adiponectin is present in the blood as a polymer or forms a complex with polymer proteins.

ヒトアディポネクチンELISAキットの開発と 血中存在様式の解析

Development of "human adiponectin ELISA kit" and analysis
for molecular form of serum adiponectin

▽ 赤松 優・阿部 みどり・立川 哲也・
△ 岩田 房子*・村口 正宏*・大本 安一*

Key Words: adiponectin, human, ELISA,
kit, molecular form

■ Abstract ■

ヒト血清（又は血漿）や脂肪細胞抽出液あるいは培養上清中のアディポネクチンを特異的に測定することができる「ヒトアディポネクチンELISAキット」を開発した。ヒト血清をゲル濾過カラムを用いて分画後、各画分を本キットで測定した結果、アディポネクチン免疫活性が、分子量670kD以上に複数本のピークとして検出された。このことから、アディポネクチンは血中で多量体として存在しているか、あるいは高分子蛋白と複合体を形成しているものと推測された。

アディポネクチン血症を伴うアディポネクチン遺伝子異常が、代謝異常症候群の臨床像を呈すること^{1, 2)}、アディポネクチンノックアウトマウスが代謝異常症候群の形質を示すこと³⁾から代謝異常症候群のキー分子であることも示された。このような背景から、血中アディポネクチン値を簡便かつ精度良く測定することを目的に、大阪大学との共同研究により、本キットを開発した。

■ はじめに

アディポネクチンは、1996年に大阪大学分子制御内科学、松澤等のグループにより脂肪組織中に特異的に発現する遺伝子 apM1 (adipose most abundant gene transcript) の遺伝子産物として同定された¹⁾。正常ヒト血中に数 μg ～ 数 $10 \mu\text{g/mL}$ と高濃度に存在するが、冠動脈疾患²⁾ や2型糖尿病、特に大血管症合併例³⁾ で血中アディポネクチンが有意に低下することや、インスリン抵抗性と相関すること⁴⁾ が報告されている。さらに低アディポネクチン血症が、冠動脈疾患死、2型糖尿病の発症リスクとなることが明らかになった^{5, 6)}。加えて、低

■ 1. 標準品および抗体の作製

本キットの標準品には、有田等が報告した¹⁰⁾ 大腸菌で発現させたりコンビナントヒトアディポネクチンを使用した。本抗原を免疫して作製したマウスモノクローナル抗体 (MoAb) ANOC9121 および、ウサギ抗血清 OCT9105 を組み合わせ、本キットを作製した。

■ 2. キットの使用方法

1) サンプル：本キットは、ヒト血清（又は血漿）や脂肪細胞抽出液あるいは培養上清中のアディポネクチンの測定が可能である。サンプルは標準操作法に従い、添付の検体前処理液を用いて5分間の加熱処理を行った後使用する。

2) 測定概略：測定概略を図1に示す。

本キットはサンドイッチELISA法を測定原理とする。抗ヒトアディポネクチン MoAb 抗体固相化プレート（抗体プレート）に、あらかじめ前処理を

Suguru Akamatsu, Midori Abe, Tetsuya Tachikawa, Fusako Iwata*, Masahiro Muraguchi*, Yasukazu Ohmoto*

〒100-8555 東京都千代田区千代田 1-3-3 大塚製薬株式会社 大塚ライフサイエンス事業部：Otsuka Life Science Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., LTD.

〒100-8555 東京都千代田区千代田 1-3-3 大塚製薬株式会社 薬効開発研究所：Research Institute of Pharmacological & Therapeutic Development Otsuka Pharmaceutical Co., LTD.

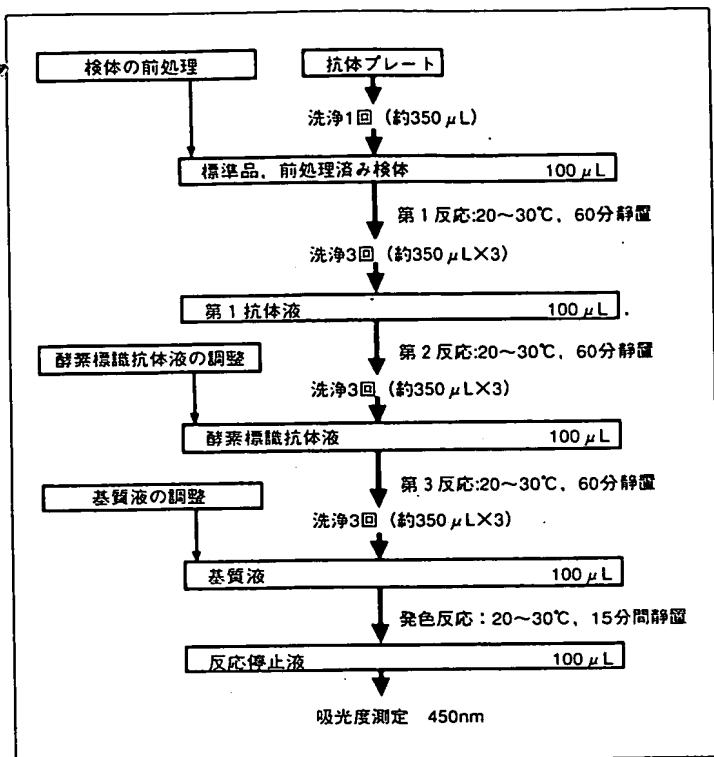


図1 ELISAキットの測定概略

行った検体又は標準液を100 μ L/ウェル加えて20~30℃で1時間反応させると、アディポネクチンが抗体プレートに結合する（第1反応）。洗浄後、抗ヒトアディポネクチン抗血清（ウサギ）（第1抗体液）を100 μ L/ウェル加えて20~30℃で1時間反応させる（第2反応）。さらに洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識抗ウサギIgGポリクローナル抗体（ヤギ）（酵素標識抗体液）を100 μ L/ウェル加えて20~30℃で1時間反応させる（第3反応）。洗浄後、基質液を加えて発色させ（発色反応）、その吸光度を450nmで測定し、同時に測定した標準液の吸光度から検体中のアディポネクチン濃度を算出する。

■ 3. 標準曲線

0, 0.375, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 ng/mLに調製した標準品を用いて作成した標準曲線の一例を図2に示す。0.375 ng/mL~12.0 ng/mLの範囲で良好な用量依存曲線が得られた。なお、自社施設における最小検出限界（Mann-WhitneyのU検定による有意差検定）は、23.4 pg/mLであったため、必

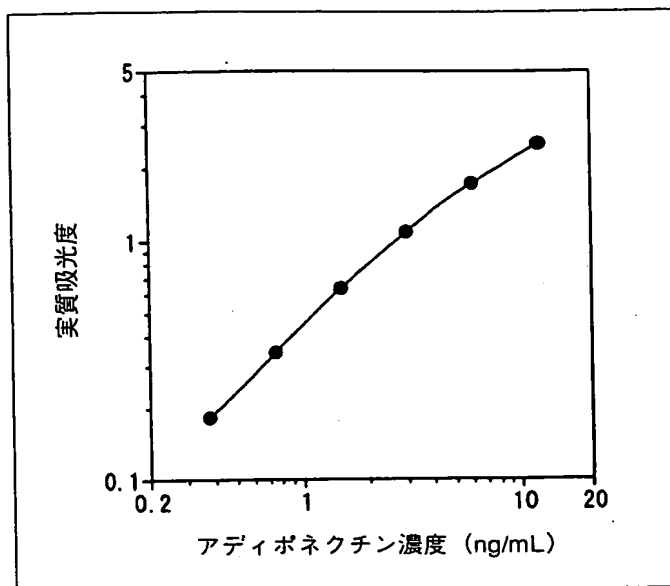


図2 標準曲線の一例

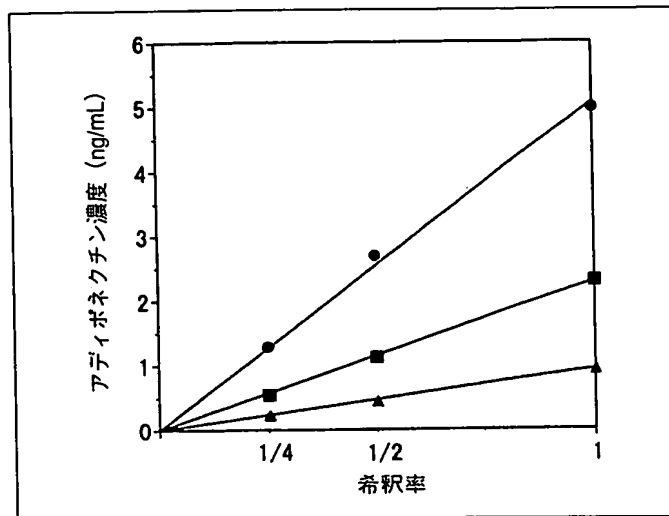


図3 ヒト血清を用いた希釈試験結果

要に応じ標準液の希釈系列を延長し、低濃度領域を正確に測定することも可能である。

■ 4. 希釈試験

3種類の異なるヒト血清を標準操作法に基づき前処理を行い、5100倍希釈後さらに2倍、4倍希釈後測定した結果を図3に示す。いずれの検体でも良好な希釈直線性が確認できた。

■ 5. 再現性

ヒト血清から調製した2種類の管理試料(H, L)を

表1 ELISAキットの再現性試験

同時再現性試験

管理試料	n	mean±SD (ng/mL)	CV (%)
H	8	2.714±0.098	3.6
L	8	0.713±0.023	3.3

測定間再現性試験

管理試料	n	mean±SD (ng/mL)	CV (%)
H	6	2.929±0.169	5.8
L	6	0.740±0.034	4.6

測定者間再現性試験

管理試料	n	mean±SD (ng/mL)	CV (%)
H	4	2.930±0.093	3.2
L	4	0.775±0.057	7.3

同時に8回測定することで同時再現性の評価を、また同試料を6回繰り返して測定することで測定間再現性の評価を行った。さらに4名の異なる測定者により測定者間再現性試験を行った結果を表1に示す。全ての試験の変動係数 (CV) は10%以下と良好な結果を示した。

■ 6. 検体の安定性

以下の安定性の結果を図4に示す。

- 1) 冷蔵 (4℃) 安定性：濃度の異なる2種類の血清を用い、未処理または前処理後5100倍希釈した状態での冷蔵安定性を評価した結果、7日間は測定値の変動を認めなかった。
- 2) 室温 (25℃) 安定性：同様に室温安定性を評価した結果、8時間までは測定値の変動を認めなかった。
- 3) 凍結融解：未処理血清および、前処理後5100倍希釈した血清で凍結融解の影響を検討した。その結果、各々5回までの凍結融解で測定値の変動は認めなかった。

■ 7. 血中アディポネクチンの解析

遺伝子配列上から推定されるアディポネクチンの分子量は約28kDであるが、血中に存在するアディポネクチンの存在様式は明らかとなっていない。今回、ゲル濾過および、Western Blotting法で血中

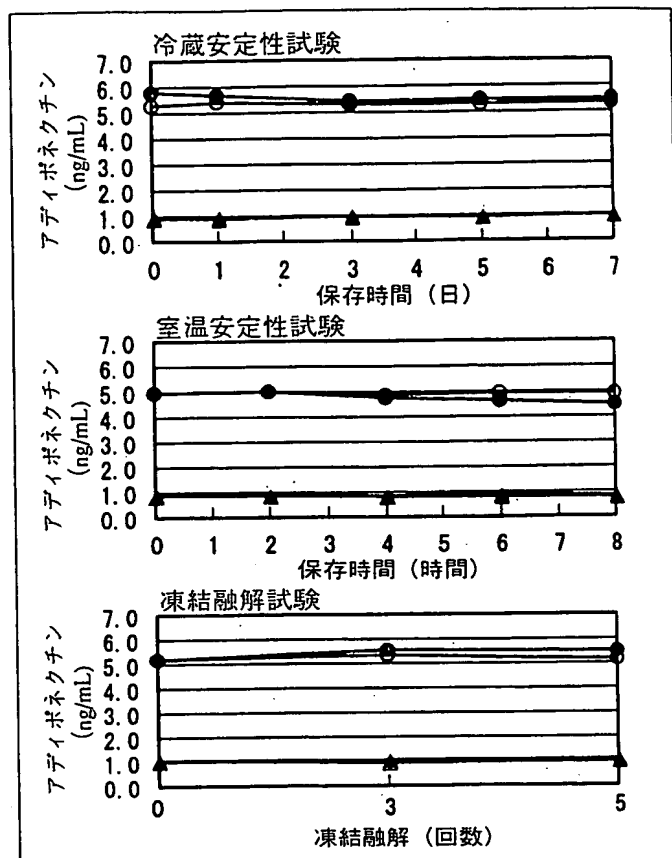


図4 血清検体の安定性試験結果
濃度の異なる2種類の血清を、未処理 (○, △), 前処理済み (●, ▲) の状態で、冷蔵 (上段)、室温 (中段) での安定性を評価した。また、凍結融解の影響 (下段) も評価した。

アディポネクチンの分子量推定を行った。

- 1) ゲル濾過法を用いた解析：50 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.2% Triton X-100, 0.5M NaClで平衡化したセファクリルS400カラム (1.5×48cm) に、同緩衝液で5倍に希釈した健常人血清300μLをアプライし、1mL/Fractionで分画した。各画分は前処理後、適宜希釈し、本キットでピークの検出を行った。その結果、約670kDの分子量および、さらに高分子量のピークが検出された (図5左)。
- 2) Western Blotting法を用いた解析：10-20%グラジエントSDS-PAGEゲルを用い、0.5μLの血清サンプルを還元下、非還元下の両条件で分画後、ニトロセルロース膜に転写した。1%スキムミルクで一晩ブロッキングした後、1μg/mLのANOC9121 MoAbおよびHRP標識抗マウスIgG抗体を反応させ

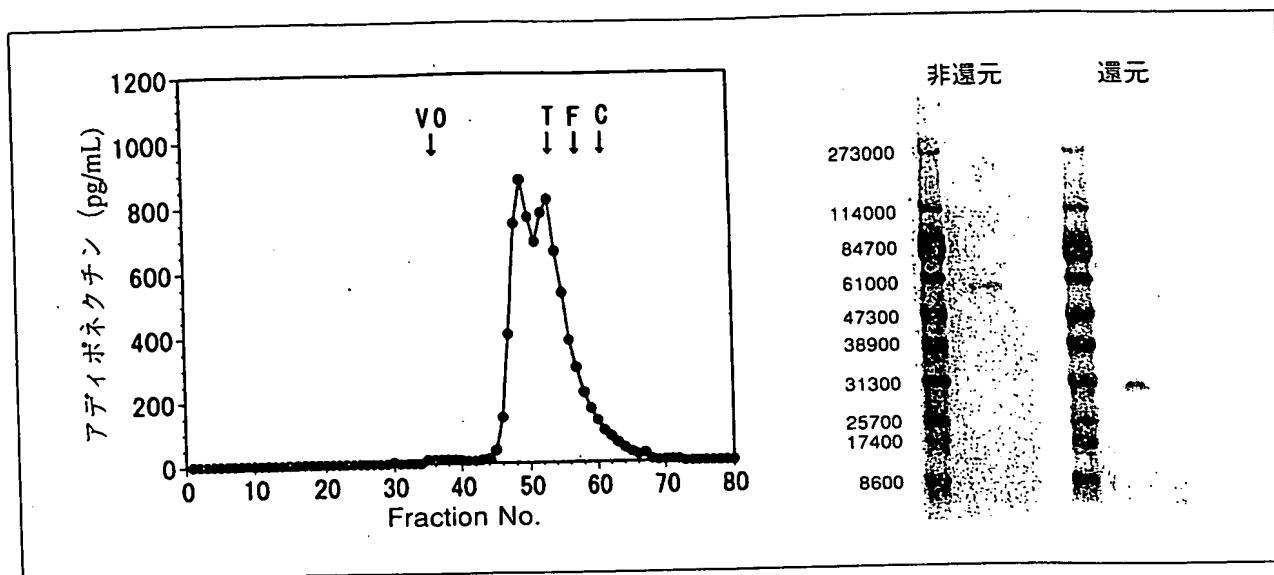


図5 血中アディポネクチンの分子量推定

ヒト血清のS400ゲル濾過パターンを図左に示す。図中のTはThyroglobulin (669kD), FはFerritin (440kD), CはCatalase (232 kD)をそれぞれ示す。図右には、同じヒト血清を還元下、非還元下でそれぞれSDS-PAGE分離し、転写後、ANOC9121MoAbを用いWestern Blotting解析した結果を示す。

た。4-クロロ-1-ナフトールを用いて発色した結果、非還元下ではアディポネクチンの2量体と推定される約60kDのバンドが、また還元下では約30kDのバンドが確認できた(図5右)。

3) 血中アディポネクチンの存在様式: Western Blotting解析から、血中アディポネクチンの基本骨格は2量体であることが推定される。しかしゲル濾過法の結果では、670kD以上の複数ピークが検出された。したがって、血中アディポネクチンは、2量体を基本とした多量体として存在するか、あるいは高分子な血中蛋白と複合体を形成して存在していることが推測された。

■ おわりに

低アディポネクチン血症は、冠動脈疾患の危険因子として捉えられ、代謝異常症候群とも強く関連することが報告されている。今回、血中アディポネクチンが多量体を、あるいは他の蛋白との複合体を形成している可能性が示された。今回の解

析では健常人血清を用いたが、今後、低アディポネクチン血症の患者血清での解析や、さらなる血中アディポネクチンの存在様式およびその生理活性との関連の解析を進めたい。

文 献

- 1) Maeda K, Okubo K, Shimomura I, *et al.*: Biochem Biophys Res Commun 221: 286-289, 1996.
- 2) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, *et al.*: Circulation 100: 2473-2476, 1999.
- 3) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, *et al.*: Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 1595-1599, 2000.
- 4) Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, *et al.*: J Clin Endocrinol Metab 86: 1930-1935, 2001.
- 5) Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, *et al.*: J Am Soc Nephrol. 13: 134-141, 2002.
- 6) Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, *et al.*: Lancet. 360: 57-58, 2002.
- 7) Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, *et al.*: Int J Obes Relat Metab Disord. 24: 861-868, 2000.
- 8) Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, *et al.*: Diabetes. 51: 2325-2328, 2002.
- 9) Matsuda M, Shimomura I, Sata M, *et al.*: J Biol Chem. 2002 Jul 22
- 10) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, *et al.*: Biochem Biophys Res Commun 257: 79-83, 1999.